



Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

Volume 21, Issue 1 (Winter 2019), 1-204

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:

Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

بررسی اثر ضدباکتریایی نانودندریمر پلی آمیدو آمین نسل پنجم در محیط کشت

سودابه علیزاده متبوع^۱ (B.Sc)، شهرام نظری^{۲*} (Ph.D)، لیلا محمدی^۳ (B.Sc)، سوسن باقری^۴ (B.Sc)، فخرالدین اکبری دورباش^۴ (M.Sc)، احمد رضا یاری^۵ (Ph.D)، سید احمد مختاری^۶ (Ph.D)، علی نیاپور^۷ (Ph.D)، سید محسن محسنی^۸ (Ph.D)

۱- دانشکده بهداشت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه بهداشت محیط، دانشکده علوم پزشکی خلخال، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۴- گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- مرکز تحقیقات آلاینده‌های محیطی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

۶- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۷- گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۸- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۵

shahramnazari73@yahoo.com

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۵۲۲۸۹۹۴۲

چکیده

هدف: پیشرفت در علوم و فناوری نانو در دهه گذشته، فرصت‌های زیادی برای بررسی اثرات بیولوژیکی از جمله اثرات ضدباکتریایی نانوذرات ایجاد کرده است. هدف از پژوهش کنونی سنتز و بررسی اثرات ضد باکتریایی نانودندریمر پلی آمیدو آمین-G5 در حذف باکتری‌های کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا، شینگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس در محیط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: نانودندریمر از طریق روش رشد واگرای Tomalia سنتز گردید. از روش‌های رقت لوله‌ای و انتشار دیسک برای تعیین اثر ضد باکتریایی نانودندریمر پلی آمید و آمین-G5 استفاده گردید. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بر اساس دستورالعمل‌های موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی به دست آورده شد. ریخت‌شناسی و اندازه نانودندریمر پلی آمید و آمین-G5 از طریق میکروسکوپ الکترونی عبوری به دست آورده شد. یافته‌ها: قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از دندریمر پلی آمید و آمین-G5 برای کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا، شینگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب برابر ۲۷، ۱۳، ۳۰ و ۱۸ میلی متر به دست آمد. در مورد قطر هاله عدم رشد بین باکتری‌های گرم منفی با باکتری گرم مثبت اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$). حداقل غلظت بازدارندگی برای کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا، شینگلا دیسانتری برابر ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای باسیلوس سوبتیلیس برابر ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. حداقل غلظت کشندگی برای شینگلا دیسانتری برابر ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، برای سودوموناس آئروژینوزا برابر ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای کلبسیلا پنومونیا و باسیلوس سوبتیلیس برابر ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نانوذرات PAMAM-G5 کروی شکل بوده و میانگین اندازه قطر ذرات ۱۰ نانومتر می باشد. نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، دندریمر پلی آمیدو آمین-G5 در حذف گونه‌های استاندارد باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت بسیار موثر است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت، نانودندریمر، پلی آمین‌ها، آزمون‌های حساسیت میکروبی

مقدمه

این رقم در کشورهای در حال توسعه به حدود ۲۵٪ افزایش پیدا می‌کند [۳، ۲]. عفونت بیمارستانی به عفونتی گفته می‌شود که در اثر برخورد میزبان با عوامل ایجادکننده عفونت، در بیمارستان روی داده باشد. این عفونت‌ها حداقل بعد از گذشت ۴۸ ساعت از بستری شدن در بیمارستان ایجاد و باعث افزایش بیماری، مرگ و میر و هزینه درمان می‌شوند [۴]. لذا ممکن است علایم عفونت در حین اقامت بیمار در بیمارستان و یا پس از ترخیص وی بروز نماید. منابع عفونت ممکن است پرسنل،

عفونت‌های بیمارستانی از علل مهم مرگ و میر در سر تا سر دنیا به حساب می‌آیند [۱]. براساس آخرین اعلامیه سازمان جهانی بهداشت در ۱۳ اکتبر ۲۰۰۵، سالانه در جهان جمعیتی بیش از ۱/۴ میلیون نفر، از عفونت‌های بیمارستانی رنج می‌برند. در کشورهای توسعه یافته صنعتی بین ۵ تا ۱۰٪ بیماران بستری شده در بیمارستان به عفونت‌های بیمارستانی مبتلا می‌شوند و

بیماران، وسایل و محیط بیمارستان باشد و میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از این منابع توسط تماس مستقیم یا غیر مستقیم به یک میزبان جدید منتقل شوند [۵]. این عفونت‌ها از دیدگاه پزشکی و پرستاری بسیار با اهمیت بوده و باعث مرگ و میر حدود ۱٪ از مبتلایان می‌گردند [۶]. اهمیت این عفونت‌ها به ویژه در افرادی که تحت عمل جراحی قرار گرفته و یا بیمارانی که آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف یا داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی مصرف می‌نمایند بسیار چشم‌گیر می‌باشد [۷]. اگرچه، بیمارانی که پاتوژن‌هایی را به محیط اطراف پخش می‌کنند، جدا از بیماران حساس نگهداری و پرستاری می‌شوند، اما مشکل عمده در بیمارستان‌ها معمولاً میکروارگانیسم‌هایی هستند که خاصیت بیماری‌زایی کم‌تری دارند و اغلب ساپروفیت و فرصت‌طلب می‌باشند [۸]. باسیل‌های گرم منفی در صدر پاتوژن‌های بیمارستانی قرار داشته و شامل سویه‌های مهاجم اشرشیاکلی و گونه‌های سودوموناس و کلبسیلا هستند که به ویژه به دلیل نیازهای رشدی اندکشان قادر به بقا در محیط بیمارستانی می‌باشند [۹]. از کوکسی‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهم‌ترین عامل عفونت محسوب می‌گردد [۱۰، ۱۱]. عفونت باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس، عفونتی فرصت‌طلب است که اگر چه فلور طبیعی سطح پوست بدن است، اما می‌تواند عامل بروز بسیاری از بیماری‌ها، از جمله کراتیت، آندوکاردیت، سیتی سمی، آبسه‌ها و ... باشد [۱۲]. پاتوژن‌های روده‌ای نظیر سالمونلا و شیگلا نیز گاهی عامل عفونت‌های بیمارستانی هستند [۱۳]. زخم‌های ناشی از سوختگی، محیط مناسبی برای رشد گونه‌های مختلف باکتریایی به شمار می‌رود. از باکتری‌های مختلفی که در زخم‌های سوختگی ایجاد عفونت می‌کنند می‌توان اعضای مختلف جنس‌های سودوموناس، باسیلوس و انتروباکتریاسه را نام برد. سودوموناس به عنوان دومین عامل عفونت‌های سوختگی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستان می‌باشد [۱۴]. گونه‌های جنس سودوموناس دارای فاکتورهای ساختاری، آنزیم‌ها و توکسین‌هایی هستند که عامل ویروانس و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و گندزداها می‌باشد. این ارگانیسم‌ها هم‌چنین می‌توانند در محیط‌های مرطوب بیمارستانی مانند غذا، ظرفشویی، دستشویی، توالت، وسایل تمیزکننده کف زمین، تجهیزات درمانی سیستم تنفسی و دیالیز، حتی محلول‌های ضدعفونی‌کننده وجود داشته باشند [۱۵]. به احتمال زیاد بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی به خاطر استفاده نامناسب و ناکافی از مواد گندزدا روی می‌دهد. هدف اصلی از به‌کارگیری گندزداها در محیط بیمارستان، کاهش خطر ابتلا به عفونت‌های بیمارستانی آندمیک و اپیدمیک در بیماران است، لذا گندزداهای

تجاری مختلفی برای پیش‌گیری و کنترل این عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، که هرکدام دارای معایب و مزایای مخصوص به خود می‌باشند [۱۶]. مواد ضد عفونی‌کننده که مصارف زیادی در مراکز بهداشت و سلامت دارند عبارتند از: الکل‌ها، ترکیبات آمونیوم ۴ ظرفیتی، ترکیبات حاوی کلر، گلو تارآلدئید، یدفورها و ترکیبات فنولیک. الکل اتانول ۷۰٪ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد باکتری‌ها را طی مدت ۱-۲ دقیقه می‌کشد. ولی در غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر از این، تاثیر کم‌تری دارد. اما در حال حاضر ایزوپروپیل ۷۰٪ و ۹۰٪ به عنوان بهترین ماده‌ی گندزدای معمولی برای اسباب و وسایل، سطوح پوستی و ... مطرح می‌باشد [۱۷، ۱۸]. اما با گذشت زمان و تخییر الکل از قدرت ضدعفونی آن کاسته می‌شود و پس از مدتی تنها رنگ الکل باقی می‌ماند و دیگر نمی‌تواند به عنوان ماده ضدعفونی‌کننده مورد استفاده قرارگیرد [۱۸]. با توجه به مطالب ذکر شده، اهمیت انتخاب و استفاده صحیح از گندزداها و ضدعفونی‌کننده‌ها در بیمارستان‌ها و به خصوص در بخش مراقبت‌های ویژه بیش از پیش احساس می‌شود. یافتن روش‌های جایگزینی ضروری است که بتوانند، بدون تولید محصولات جانبی گندزدایی، کارآیی بالایی در حذف میکروب‌های بیماری‌زا داشته باشند [۱۹]. ضدعفونی‌کننده‌های مورد مصرف بایستی برعلیه کوکسی‌های گرم مثبت، باسیل‌های گرم منفی، باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار و میسلیوم‌های قارچی دارای قدرت اثربخشی مؤثر باشند [۲۰]. نانوذرات علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت خاصیت ضدباکتریایی بسیار خوبی دارند [۲۱]. نانوذرات آهن [۲۲]، نانوذرات آلوم ناشی از فرآیند الکتروشیمیایی [۲۳]، نانوحامل‌های آلی اصلاح شده با عوامل ضد میکروبی، مواد هیبریدی و پلیمرها نمونه‌هایی از نانوذرات دارای خاصیت ضد میکروبی هستند [۲۴]. بعضی از پلیمرها مانند دندیرم‌ها دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند که در مقایسه با سایر عوامل ضد باکتریایی موجود کارایی بالاتری دارند [۲۵، ۲۶]. دندیرم‌ها مولکول‌های درخت‌سان پرشاخه‌ای هستند که دارای خواص منحصر به فرد از جمله؛ اندازه مولکولی نسبتاً بزرگ، تشکیل شده از یک هسته مرکزی، توزیع یک نواخت اندازه، ساختار کروی و سهولت مشتق‌سازی آن از طریق گروه‌های عاملی جانبی می‌باشد [۲۷]. دو دسته از متداول‌ترین دندیرم‌ها شامل دندیرم‌های پلی‌آمیدوآمین و پلی‌پروپیلن ایمین می‌باشد که به صورت تجاری موجود است [۲۸، ۲۹]. گروه‌های سطحی که به مولکول‌های دندیرم متصل می‌شوند بسیار متنوع می‌باشند. این گروه‌ها شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر می‌باشد. این خصوصیات سبب شده است مطالعاتی در زمینه پتانسیل

لذا ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی دندریمرها و امکان استفاده از آن‌ها به عنوان عامل ضد باکتریایی، می‌تواند مورد پژوهش قرار گیرد. تا کنون مطالعاتی در زمینه ویژگی‌های ضدباکتریایی دندریمرها انجام شده است. مطالعه غلامی و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که دندریمر پلی آمیدوآمین نسل هفتم از رشد باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری می‌نماید [۳۶]. الکساندر و همکارانش (۲۰۱۲) نشان داد که دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل چهارم در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از فعالیت ضد باکتریایی خوبی برخوردار است [۳۲]. در مطالعه ژوو و همکارانش (۲۰۱۳) مشخص شد که دندریمر پلی آمیدوآمین نسل دوم از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌نماید [۳۷].

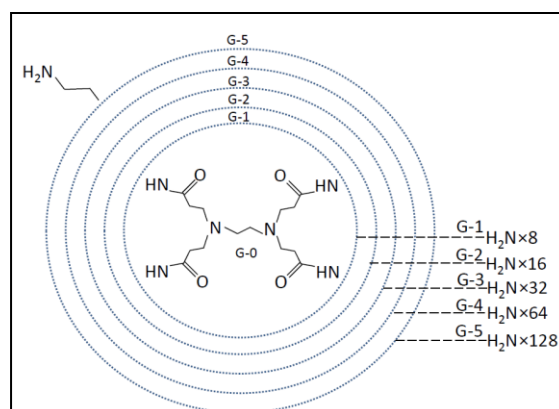
با توجه به این‌که تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در دندریمرهای از نوع پلی آمیدوآمین در هر نسل دو برابر می‌شود، بنابراین انتظار می‌رود اثر ضدباکتریایی در نسل‌های مختلف متفاوت باشد. همچنین با توجه به این‌که در بحث ضد عفونی کننده‌ها و گندزداها تعیین غلظت موثر بسیار مهم است و روش استاندارد (دستورالعمل‌های موسسه‌ی استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی) که برای تعیین غلظت موثر ماده ضدباکتریایی به کار گرفته می‌شود تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی می‌باشد. بنابراین لازم است تمامی نسل‌های دندریمر پلی آمیدوآمین مورد مطالعه قرار بگیرد تا غلظت موثر هر نسل تعیین گردد. همچنین به دلیل این‌که ۹۰٪ از عفونت‌های بیمارستانی توسط باکتری‌های ایجاد می‌گردند و باکتری‌ها دائماً در حال مقاوم شدن به انواع گندزداها و ضد عفونی کننده‌ها می‌باشند [۳۸]. بنابراین این مطالعه با هدف سنتز و تعیین اثر ضد باکتریایی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل پنجم (Polyamidoamine-G5-PAMAM-G5) بر روی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس انجام شد.

مواد و روش‌ها

سنتز و مشخصات نانودندریمر PAMAM-G5

مطالعه به صورت تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی انجام گردید. پژوهش کنونی در تابستان و پاییز ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی علوم پزشکی اردبیل انجام گردید. در مطالعه‌ی حاضر، نانودندریمرهای PAMAM مطابق روش ذیل سنتز گردید [۳۹]. در داخل یک بالن ته‌گرد حاوی ۱۰۰ میلی لیتر متانول، اتیلن دی آمین (۱۰ گرم یا ۱۶۶/۰

کاربردهای زیست پزشکی از جمله حمل دارو، انتقال ژن و تصویربرداری انجام شود. همچنین اخیراً تحقیقاتی بر روی فعالیت ضد میکروبی مشتقات دندریمر انجام شده است. در بیش‌تر موارد، دندریمرها به عنوان حامل عوامل فعال بیولوژیکی از طریق کپسوله کردن آن‌ها در داخل یا اغلب موارد با اتصال داخلی بر روی شاخه‌های دندریمرها به کار می‌روند. دندریمرهای پلی آمیدوآمین با گروه انتهایی آمینی اثر ضدباکتریایی بالایی دارد [۲۷]. دندریمرهای پلی آمیدوآمین دارای بخش کاتیونی هستند که می‌توانند با بار منفی که بر روی سطح سلول‌های باکتریایی قرار دارند فعل و انفعال الکترواستاتیکی داشته باشند. بسته به غلظت دندریمرها نفوذپذیری غشای باکتری‌ها تغییر پیدا می‌کند و در نهایت سبب اختلال در دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود [۳۱، ۳۰]. تعداد گروه‌های انتهایی نانو دندریمرهای پلی آمیدوآمین با هسته اتیلن دی آمین با افزایش هر نسل دو برابر می‌شود. ما تصویری از نانودندریمر PAMAM-G7 که تعداد گروه‌های انتهایی آمینی را با افزایش هر نسل نشان می‌دهد، طراحی کردیم (شکل ۱).



شکل ۱: افزایش تعداد گروه‌های انتهایی آمینی دندریمر پلی آمید و آمین با افزایش تا نسل پنجم (پلی آمید و آمین - G5)

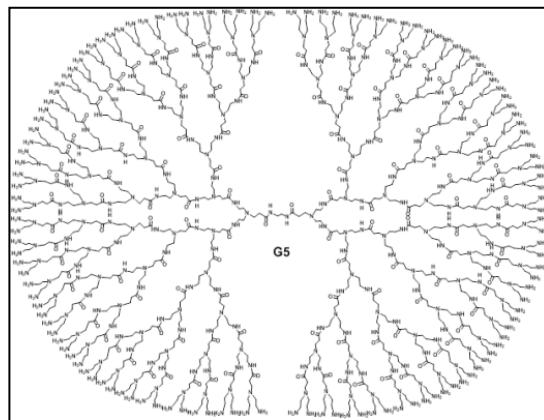
مطالعات نشان داده‌اند، حداقل سمیت دندریمرها بر روی سلول‌های یوکاریوتیک به دلیل شباهتی که با برخی از پروتئین‌های بدن دارند، می‌باشد [۳۳، ۳۲]. غلامی و همکاران و همچنین رستگار و همکاران سمیت سلولی نسل‌های مختلف دندریمر PAMAM را در مقابل رده سلول‌های سرطانی انسانی بررسی کرده‌اند و نشان داده‌اند که سمیت سلولی این نوع دندریمرها بستگی به غلظت و زمان تماس دارد و در غلظت‌هایی که خاصیت ضدباکتریایی مشاهده گردید سمیت سلولی آن‌ها نسبتاً کم‌تر بود [۳۵، ۳۴].

سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853، شیگلا دیسانتری ATCC 13313 و گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس ATCC 23857 می‌باشد که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری گردید. برای فعال‌سازی باکتری‌ها از محیط کشت نوترینت برات استفاده گردید که در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت برات مقداری برداشته و بروی محیط‌های کشت اختصاصی (برای باسیلوس سوبتیلیس از محیط کشت باسیلوس آگار، برای شیگلا دیسانتری از SS آگار، برای سودوموناس آئروژینوزا از سیت‌ماید آگار و برای کلبسیلا پنومونیا از مکانکی آگار استفاده گردید) هر سویه باکتری، به حالت خطی یک‌نواخت کشت داده شد. سپس محیط‌ها به حالت وارونه در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند [۴۰]. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود.

تهیه رقت باکتریایی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند. در این پژوهش، استاندارد مک فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد [۴۱]. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. جذب نوری کدورت ایجاد شده توسط محلول نیم‌مک فارلند (شامل اسید سولفوریک و کلروباربوم) در طول موج ۶۱۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (مدل Hach) اندازه‌گیری گردید که دارای میزان جذب نوری ۰/۱ - ۰/۰۹ بود. کلنی‌های باکتری تا حدی به آب اضافه گردید تا کدورت ایجاد شده توسط باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه‌گیری شده در لوله استاندارد ۰/۵ مک فارلند (برابر با $10^8 \times 1/5$ CFU/ml) باشد.

آزمایشات تعیین قطر هاله عدم رشد. از کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با استاندارد نیم‌مک فارلند در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار به وسیله سواب استریل به صورت یک‌نواخت کشت داده شدند. از نانودریمر مادر، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از آب مقطر استریل شده به روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شدند. سپس دیسک‌های خالی (Blank disk) ۶ میلی‌متری در شرایط کاملاً استریل به ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانودریمر-PAMAM-G5 آغشته و به منظور خشک شدن به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس دیسک‌ها در داخل پلیت‌ها به فاصله مناسب قرار گرفته و پس

مول) حل گردید. در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد متیل اکریلات (۹۴/۶ گرم یا ۰/۷۵۱ مول) اضافه شد و سیستم تحت نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. در دمای اتاق متیل‌اکریلات اضافی تحت خلا حذف شد. یک واکنش افزودن Michael بین آمین و اکریلات محصولی با ۴ گروه متیل استر انتهایی به دست می‌دهد که تحت عنوان G0.5 NPAMAM تعریف می‌شود. سپس، اتیلن دی‌آمین (۱۲۰ گرم یا ۲ مول) در متانول حل شده و به G0.5 NPAMAM اضافه و بعد از هم زدن به مدت ۴۸ ساعت تحت نیتروژن و حذف واکنش‌گرهای اضافی توسط تقطیر خلا، محصولی به دست آمد که دارای ۴ گروه انتهایی آمین بوده و تحت عنوان NPAMAM-G1 تعریف می‌شود. نانودریمرهای PAMAM نسل بالاتر با تکرار چرخه‌ی بالا سنتز شدند. برای تعیین خصوصیات و گروه‌های عاملی دندریمر PAMAM-G5 از آنالیز Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) استفاده گردید و هم‌چنین برای ریخت‌شناسی و تعیین اندازه دندریمر PAMAM-G5 از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM, Philips CM 30) و transmission electron microscopy استفاده شد. ویژگی‌ها و ساختار شیمیایی نانودریمر PAMAM-G5 به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: ساختار شیمیایی دندریمر پلی‌آمینو-آمین-G5

جدول ۱. ویژگی‌های شیمیایی دندریمر پلی‌آمینو-آمین-G5

فرمول مولکولی	نسل دندریمر	وزن مولکولی (گرم بر مول)	تعداد اتمی آمینو	تعداد اتمی آمینو	تعداد گروه‌های آمینو
C1262H2528N506O252	۵	۲۸۸۲۶	۱۲۸	۱۲۶	۱۲۶

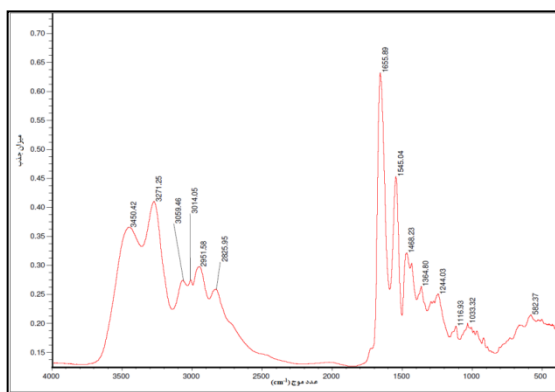
آماده‌سازی سویه‌های باکتریایی

سویه‌های باکتری استفاده شده در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونیا ATCC 1705،

از نرم افزار (SPSS software, version 14 (SPSS, Inc., از نرم افزار (Chicago, IL, USA) برای سنجش آماری داده ها و از Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) برای رسم نمودارها استفاده گردید. برای تعیین اختلاف قطر هاله عدم رشد در باکتری های گرم منفی و گرم مثبت از آزمون آماری من ویتنی (Man Withney) استفاده گردید.

نتایج

شکل ۳ مشخصات گروه عاملی نانودندریمر PAMAM-G5، که از طریق FTIR اندازه گرفته شده است را نشان می دهد. پیک های نشان داده شده در عدد موج های ۴۰۰ تا cm^{-1} به موارد زیر اختصاص دارد: نوسانات پیک های cm^{-1} ۳۴۵۰/۴۲ و cm^{-1} ۳۲۷۱/۲۵ به ترتیب مربوط به N-H گروه های آمین و آمید اولیه می باشد. پیک های cm^{-1} ۲۹۵۱/۵۸ به کشش C-H نسبت داده می شود. پیک های cm^{-1} ۱۳۶۴/۸۰ و cm^{-1} ۱۰۳۳/۳۲ به نوسانات کششی گروه های C-N و C-O مربوط است. پیک های cm^{-1} ۱۶۵۵/۸۹ و cm^{-1} ۱۵۴۵/۰۴ توصیف کننده کشش C=O و اتصال بین N-H گروه های آمیدی می باشد [۴۳، ۴۲]. ریخت شناسی و قطر نانوذرات PAMAM-G5 از طریق TEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). همان طور که شکل ۴ نشان می دهد نانوذرات PAMAM-G5 کروی شکل و میانگین اندازه قطر ذرات ۱۰ نانومتر می باشد.

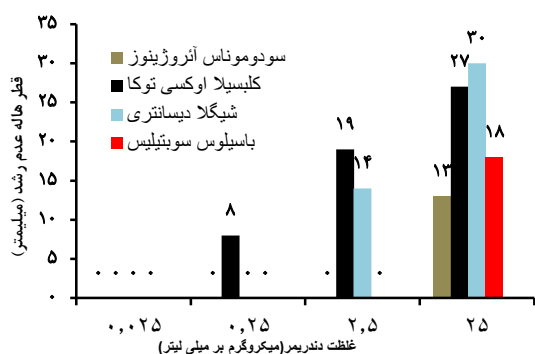


شکل ۳. طیف سنجی تبدیلی فوریه مادون قرمز (FTIR) دندریمر پلی آمید

و آمین-G5

از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش برای هر کدام از آن ها اندازه گیری و بر حسب میلی متر گزارش گردید. تعداد نمونه ها برای قطر هاله عدم رشد باکتری ها در غلظت های مختلف نانودندریمر، با توجه به احتساب چهار غلظت نانودندریمر، چهار باکتری مورد مطالعه و سه بار تکرار برابر ۴۸ عدد به دست آمد.

آزمایشات حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) از روش رقت لوله ای استفاده شد. در این روش از هفت لوله برای غلظت های مختلف نانودندریمر PAMAM-G5 و یک لوله شاهد برای کنترل مثبت و یک لوله شاهد برای کنترل منفی استفاده شد. شاهد مثبت شامل محیط کشت و باکتری که ماده ضد باکتریایی به آن اضافه نشده است. هم چنین شاهد منفی شامل محیط کشت حاوی ماده ضد باکتریایی بدون باکتری بود. به دلیل تعیین مقدار دقیق MIC و MBC هر باکتری، ادامه آزمایشات با غلظت های مختلف (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نانودندریمر PAMAM-G5 انجام داده شد. به لوله های آزمایش ۹ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت برات، ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های مختلف نانودندریمر-PAMAM-G5 و ۰/۵ میلی لیتر از رقت باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور گرم خانه گذاری شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند. لوله ای با کم ترین غلظت از نانودندریمر که رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی انتخاب شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نانودندریمر، از لوله هایی که رشد در آن ها مشاهده نشده بود بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند. بعد از گرم خانه گذاری پلیت مربوط به لوله ای که حاوی کم ترین غلظت از نانودندریمر در آن بود و رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش ها برابر با دستورالعمل های موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute-CLSI) انجام شد [۴۰].

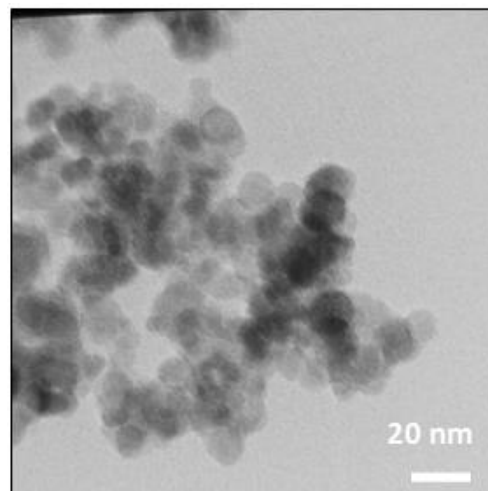


شکل ۵. قطر هاله ی عدم رشد باکتری ها در غلظت های مختلف دندریمر PAMAM-G5



شکل ۴: تاثیر غلظت های مختلف دندریمر PAMAM-G5 بر قطر هاله عدم رشد باکتری کلیمسیلا پنومونیا

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی دندریمر برای هر یک از باکتری ها مورد مطالعه به دست آورده شد. همان طور که جدول ۲ نشان می دهد حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری های کلیمسیلا پنومونیا، سودوموناس آئروژینوزا و شیگلا دیسانتری برابر با ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس برابر با ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. حداقل غلظت کشندگی دندریمر برای باکتری شیگلا دیسانتری برابر با ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای کلیمسیلا پنومونیا و باسیلوس سوبتیلیس برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. باکتری شیگلا دیسانتری به ترتیب با غلظت ۲/۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر، کمترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی را به خود اختصاص داده است، به عبارتی حساسیت بالا و مقاومت کمتری در برابر دندریمر دارد. سودوموناس آئروژینوزا با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر بیشترین مقدار حداقل غلظت کشندگی را به خود اختصاص داد.



شکل ۴. تصویر نانوذرات PAMAM-G5 با میکروسکوپ الکترونی عبوری

نتایج حاصل از تاثیر غلظت های مختلف دندریمر PAMAM-G5 به روش دیسک دیفیوژن در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد دندریمر PAMAM-G5 از رشد باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، کلیمسیلا پنومونیا، شیگلا دیسانتری و باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس جلوگیری نموده و از نظر قطر هاله عدم رشد بین باکتری های گرم منفی و گرم مثبت تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p < 0.05$). این اثر بازدارندگی بر روی باکتری ها با افزایش غلظت دندریمر، افزایش یافت که به صورت قطر هاله ی عدم رشد مشاهده گردید. به طور مثال، افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری کلیمسیلا پنومونیا با افزایش غلظت دندریمر در شکل ۶ نشان داده شده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری های شیگلا دیسانتری و کلیمسیلا پنومونیا در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر به ترتیب برابر ۳۰ و ۲۷ میلی متر به دست آمد و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا به دست آمد به طوری که فقط در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر، قطر هاله عدم رشد به اندازه ۱۳ میلی متر مشاهده گردید. غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر هیچ تاثیری بر روی باکتری های مورد مطالعه نداشت و غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر فقط بر روی باکتری کلیمسیلا پنومونیا اثرگذار بود و در این غلظت قطر هاله عدم رشد ۸ میلی متر به دست آمد. غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر فقط بر روی باکتری های کلیمسیلا پنومونیا و شیگلا دیسانتری تاثیرگذار بود به طوری که قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۱۹ و ۱۴ میلی متر به دست آمد. غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر بر روی همه باکتری های مورد مطالعه اثرگذار بود و افزایش قطر هاله عدم رشد نسبت به غلظت های پایین تر دندریمر، چشمگیر بود.

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی دندریمر PAMAM-G5

غلظت دندریمر پلی آمیدوآمین-G5 (میکرو گرم بر میلی لیتر)				تاثیر بر رشد باکتری ها	
				شیرکلا دیسانتری	باسیلوس سوبتیلیس
				سودوموناس آئروژینوزا	کلبسیلا پنومونیا
شاهد (کنترل منفی)	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
شاهد (کنترل مثبت)	رشد	رشد	رشد	رشد	رشد
۰/۰۲۵	رشد	رشد	رشد	رشد	رشد
۰/۲۵	رشد	رشد	رشد	رشد	رشد
۲/۵	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
۲۵	B.S	B.S	B.S	B.S	B.S
۵۰	B.S	B.S	B.S	B.S	B.S
۱۰۰	MBC	B.S	MBC	B.C	MBC
۲۰۰	B.C	MBC- B.C	B.C	B.C	B.C

B.C: Bactericidal و B.S: Bacteriostatic

بحث و نتیجه گیری

عفونت هایب بیمارستانی به دلیل مرگ و میر و هزینه های اقتصادی، یکی از مهم ترین چالش هایی است که بخش مراقبت ویژه هر بیمارستان با آن مواجهه است و بیش ترین درصد عفونت های بیمارستانی توسط باکتری ها ایجاد می گردد [۳۸]. در این مطالعه از دندریمر PAMAM-G5 برای ارزیابی تاثیر آن بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی ایجادکننده عفونت های بیمارستانی استفاده شد. این مطالعه نشان داد دندریمر PAMAM-G5 خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی در حذف باکتری های گرم منفی و گرم مثبت دارد. نمودار ۲ نشان می دهد با افزایش غلظت دندریمر از ۰/۰۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر قطر هاله عدم رشد برای تمامی باکتری ها به طور چشم گیر افزایش یافته است و این نشانگر این است که نسبت بقاء باکتری ها با افزایش غلظت دندریمر کاهش یافته است.

در مطالعه ای که توسط ایزانلو و همکاران (۲۰۱۴) بر روی اثر ضد باکتریایی نانودندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم با روش دیسک دیفیوژن انجام داده بودند به این نتیجه رسیدند که این نانوذره بر روی باکتری های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی اثر ضد باکتریایی دارد ولی بر روی باکتری آنتروباکتر کلوآکه هیچ گونه اثر ضد باکتریایی ندارد و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانودندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم قطر هاله عدم رشد برای باکتری های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و آنتروباکتر کلوآکه به ترتیب برابر ۳۵، ۲۹، ۱۴ و صفر میلی متر بود [۳۳].

در مطالعه ای دیگری که توسط ایزانلو و همکاران (۲۰۱۴) در مورد اثر ضد باکتریایی نانودندریمر پلی پروپیلین ایمن نسل دوم و پلی آمیدوآمین نسل چهارم با روش دیسک دیفیوژن انجام داده بودند، نشان داده اند که در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانودندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم قطر هاله عدم رشد برای باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا اوکسی توکا و پروتئوس میرابیلیس به ترتیب برابر صفر، ۲۰ و ۱۸ میلی متر می باشد و قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از دندریمر پلی پروپیلین ایمن نسل دوم برای باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا اوکسی توکا و پروتئوس میرابیلیس به ترتیب برابر ۲۰، ۲۵ و ۱۵ میلی متر به دست آمد. همچنین این مطالعه آشکار کرد غلظت های ۰/۵، ۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانودندریمر پلی آمیدوآمین- نسل چهارم هیچ گونه تاثیری بر روی باکتری های مورد ندارد [۴۴]. در مطالعه ای که در مورد تاثیر ضدباکتریایی نانوذرات CeO_2 ، ZrO_2 ، Al_2O_3 ، MgO ، Fe_3O_4 بر روی باکتری کلبسیلا انجام شده بود، یافتند که قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب برابر ۸، ۶، ۶ و ۸ میلی متر بود. نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد [۴۵]. شکل ۱ مربوط به خصوصیات گروه های عاملی دندریمر PAMAM-G5 می باشد که از طریق FTIR نشان داده شده است. پیک ۳۴۵۰/۴۲ مربوط به گروه های آمینی دندریمر PAMAM-G5 می باشد. تاثیر ضدباکتریایی بالاتر دندریمر PAMAM-G5 نسبت به نسل های پایین تر را می توان به تعداد بیش تر گروه انتهایی آمینی آن ها نسبت داد. هر چه قدر تعداد گروه انتهایی آمینی بیش تر باشد به همان نسبت خاصیت

باکتری کشی دندیرم افزایش خواهد یافت. همان‌طور که شکل یک نیز نشان می‌دهد، تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در دندیرم PAMAM-G4 برابر ۶۴ عدد در حالی که این تعداد در دندیرم PAMAM-G5 برابر ۱۲۸ عدد می‌باشد [۴۶].

گروه‌های انتهایی آمینی با جذب شدن بر روی سطح سلول باکتری‌ها به دیواره سلولی نفوذ پیدا می‌کنند و سپس با اتصال به غشاء سیتوپلاسمی آن را متلاشی می‌کنند. با متلاشی شدن غشاء سیتوپلاسمی الکترولیت‌هایی از قبیل یون‌های پتاسیم و فسفات و مواد هسته‌ای از قبیل DNA و RNA از سلول خارج می‌شوند. در نتیجه می‌توان گفت خاصیت ضد باکتریایی دندیرم‌ها به واسطه گروه‌های انتهایی آمینی می‌باشد که سبب اختلال در غشاء داخلی و خارجی باکتری‌ها می‌شود [۳۰]. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به باکتری‌های کلبسیلا پنومونیا، شیگلا دیسانتری و باسیلوس سوبتیلیس در مقابل عامل ضدباکتریایی از مقاومت بالاتری برخوردار بوده و فقط در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دندیرم هاله عدم رشد داشت (۱۳ میلی‌متر). همچنین جدول ۲ نشان می‌دهد بیش‌ترین مقدار حداقل غلظت کشندگی مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دندیرم). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که باکتری سودوموناس آئروژینوزا شایع‌ترین باکتری عفونت‌زا در محیط‌های بیمارستانی می‌باشد که اغلب منجر به عفونت‌های بیمارستانی خطرناکی در افراد با سیستم ایمنی ضعیف شده می‌گردد [۴۸، ۴۷]. مشکل مهم درمان عفونت‌های سودوموناسی، مقاومت بالای این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی است که از نظر ساختاری و عمل‌کردی هیچ شباهتی با یک‌دیگر ندارند [۴۷]. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری ناشی از مقاومت ذاتی به دلیل نفوذپذیری کم، وجود سیستم‌های تراوشی، اکتساب ژن مقاومت از طریق پلاسمید، ترانسپوزون‌ها، اینتگرون‌ها و تولید بیوفیلم می‌باشد. پمپ‌های تراوشی می‌توانند طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی را بدون هیچ‌گونه شباهتی بین ساختار و عملکردشان تراوش نمایند. آنتی‌بیوتیک‌هایی که به منظور درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به کار برده می‌شوند، در زمره این ترکیبات توکسیک به شمار می‌روند و خروج آن‌ها از سلول باکتری، کاهش چشمگیری در اثر درمانی آن‌ها دارد [۴۹]. مطالعه‌ای نشان داد که باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیش‌ترین درصد مقاومت را نسبت به سفتی‌زوکسیم (۹۲/۳۵٪) و کم‌ترین میزان مقاومت را نسبت به ایمپنم (۵٪) دارد [۵۰]. مطالعه دیگر نیز نشان داد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به سیپروفلوکساسین ۶۷٪، سفنازیدیم ۷۱٪ و ایمپنم ۴۱٪ مقاومت پیدا کرده‌اند [۵۱].

در یک بررسی که در مورد سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران سوختگی انجام شده بود به این نتیجه رسیدند که این سویه‌ها ۱۰۰٪ مقاومت نسبت به جنتامیسین، سیپروفلوکساسین، سفنازیدیم، آمیکاسین و توبرامایسین پیدا کرده‌اند [۵۲]. یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج بررسی آن‌ها مطابقت دارد. پس می‌توان گفت احتمال تاثیر کم‌تر غلظت‌های پایین‌تر دندیرم PAMAM-G5 بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به سایر باکتری‌های مورد مطالعه به دلیل مقاومت ذاتی و اکتسابی باشد. با این حال مطالعه حاضر نشان داد دندیرم PAMAM-G5 می‌تواند از رشد این باکتری نیز ممانعت کند. جدول ۲ نشان می‌دهد مقدار حداقل غلظت بازدارندگی باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس بیش‌تر از باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیا و شیگلا دیسانتری می‌باشد. علاوه بر این باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس قطر هاله عدم رشد کم‌تری در همه غلظت‌های دندیرم نسبت به باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونیا و شیگلا دیسانتری داشت. حتی در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۲۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دندیرم قطر هاله عدم رشد باسیلوس سوبتیلیس برابر صفر بود. در مطالعه‌ای که خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره و اکسید روی در حالت منفرد و ترکیب با یک‌دیگر بررسی شده بود. نتایج مطالعه نشان داد سویه‌های گرم منفی نسبت به سویه‌های گرم مثبت در مقابل ترکیب دو نانوذره حساسیت بیش‌تری دارند [۵۳]. در یک مطالعه‌ای که در مورد نحوه اثرگذاری نانوذرات بر روی باکتری‌های انجام شده بود به این نتیجه رسیدند، میزان تجمع بار منفی بر روی سطح سلولی باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. برهم‌کنش بین نانو ذرات دارای بار مثبت و دیواره‌ی سلولی دارای بار منفی منجر به نشست محتوبات درون سلول باکتری می‌شود [۵۴].

در یک بررسی که اثر نانوذرات اکسید روی بر رشد باکتری‌های اشرشیاکلی O157:H7 و باسیلوس سوبتیلیس انجام شده بود به این نتیجه رسیدند که باکتری گرم منفی اشرشیاکلی O157:H7 نسبت به باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس حساسیت بیش‌تری دارد [۵۵]. در یک بررسی انجام شده در مورد اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به این نتیجه رسیدند که مقاومت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیش‌تر از اشرشیاکلی می‌باشد و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب برای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱۲۵۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۵۶]. نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

هزینه‌های آن تشکر و قدرانی می‌گردد. هم‌چنین از آقای آرزانی کارشناس آزمایشگاه میکروبی‌شناسی پزشکی به جهت همکاری کامل در انجام این پروژه کمال تشکر را داریم.

منابع

- [1] Toulabi T, Janani F, Qurbanmohammadi E. The appropriateness of educational programs' objectives for professional needs: the viewpoints of Khorramabad school of nursing and midwifery graduates. Iran J Med Educ 2009; 8: 263-273.
- [2] Whitehouse JD, Friedman ND, Kirkland KB, Richardson WJ, Sexton DJ. The impact of surgical-site infections following orthopedic surgery at a community hospital and a university hospital: adverse quality of life, excess length of stay, and extra cost. Infect Control Hosp Epidemiol 2002; 23: 183-189.
- [3] Kampf G, Kramer A. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 863-893.
- [4] Saint S, Kowalski CP, Kaufman SR, Hofer TP, Kauffman CA, Olmsted RN, Forman J, Banaszak-Holl J, Damschroder L, Krein SL. Preventing hospital-acquired urinary tract infection in the United States: a national study. Clin Infect Dis 2008; 46: 243-250.
- [5] Krein SL, Kowalski CP, Hofer TP, Saint S. Preventing hospital-acquired infections: a national survey of practices reported by U.S. hospitals in 2005 and 2009. J Gen Intern Med 2012; 27: 773-779.
- [6] Al-Ghamdi S, Gedebo M, Bilal N. Nosocomial infections and misuse of antibiotics in a provincial community hospital, Saudi Arabia. J Hosp Infect 2002; 50: 115-121.
- [7] Craven DE, Kunches LM, Kilinsky V, Lichtenberg DA, Make BJ, McCabe WR. Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation. Am Rev Respir Dis 1986; 133: 792-796.
- [8] Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: a laboratory manual: Pearson/Benjamin Cummings; 2008; p: 86.
- [9] Burke JP. Infection control-a problem for patient safety. N Engl J Med 2003; 348: 651-656.
- [10] Meshkibaf MH, Abdollahi A, Fasihi Ramandi M, Adnani Sadati SJ, Moravvej A, Hatami S. Antibacterial effects of hydro-alcoholic extracts of Ziziphora tenuior, Teucrium polium, Barberis corcorde and Stachys inflata. Koomesh 2010; 11: 240-244. (Persian).
- [11] Abdal N, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. Koomesh 2014; 16: 82-89. (Persian).
- [12] Zamanzad B, kherad var D. The sensitivity pattern of bacteria extracted from medical instruments of different wards of Kashani hospital to routine antibacterial agents, Shahrekord, 1996. J Shahrekord Univ Med Sci 2002; 3: 25-30. (Persian).
- [13] Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Mil Med 2012; 14: 143-147.
- [14] Rajaie S, Mohammadi Sichani M, Yousefi MH. Study on the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wounds. Qom Univ Med Sci J 2015; 9: 30-37. (Persian).
- [15] Hoseinzadeh E, Samarghandi MR, Alikhani MY, Asgari Gh, Roshanaei Gh. Effect of Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles on death kinetic of gram-negative and positive bacterium. J Babol Univ Med Sci 2012; 14: 13-19 (Persian).
- [16] Halfmann H, Bibinov N, Wunderlich J, Awakowicz P. A double inductively coupled plasma for sterilization of medical devices. J Phys Appl Phys 2007; 40: 4145.
- [17] Roshaliza H, Liu C, Joanna O. Can the use of 70% isopropyl alcohol swab or aspiration using 5 microm Filter Straw reduce bacterial contamination of fentanyl solution used for regional anaesthesia? Med J Malaysia 2011; 66: 92-94.
- [18] Jokar A, Mohebi Z, Garmaznejad S, Sharifi M. A comparison of efficacy of isopropyl alcohol and ethanol in disinfection programs in pediatrics ward and neonatal intensive care unit. Hayat 2009; 15: 52-58. (Persian).
- [19] Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJ. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and

علت حساسیت کم‌تر یا مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به وجود لایه‌ی پیتیدوگلیکان ضخیم‌تر نسبت داده می‌شود. دیواره سلولی و مقدار ماده سازنده غشاء پیتیدوگلیکان از تفاوت اصلی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد [۵۷]. بنابراین انتظار می‌رود، مقاومت بیش‌تری در مقابل عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند. با این حال، در برخی مطالعات نتایجی عکس نتایج فوق گزارش شده است. در یک مطالعه خاصیت ضدباکتریایی دندیرم‌های پیتیدی با وزن مولکولی پایین، بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفته بود. نتایج مطالعه نشان داد در اکثر دندیرم‌های پیتیدی مورد بررسی، تاثیر دندیرم بر باکتری اشرشیاکلی ضعیف‌تر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بوده است [۵۸].

در یک بررسی که در مورد اثر ضد باکتریایی نانوذرات دی اکسید سیلیکون، اکسید روی و دی اکسید تیتانیوم بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس انجام شده بود، نشان داد که بیش‌ترین مقاومت نسبت به نانوذرات مربوط به باکتری اشرشیاکلی می‌باشد [۵۹]. در مطالعه‌ای که در مورد خاصیت ضد باکتریایی دندیرم پلی پروپیلن ایمین نسل چهارم بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا انجام شده بود. دریافتند که دندیرم پلی پروپیلن ایمین نسل چهارم بیش‌ترین تاثیر ضدباکتریایی را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت دارد [۳۲].

بر اساس نتایج این مطالعه نانودندیرم PAMAM-G5 برای حذف باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونیا، شیگلا دیسانتری، سودوموناس آئروژینوزا و باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس بسیار موثر می‌باشد. حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز خاصیت ضدباکتریایی نسبتاً مناسبی دارد. در ادامه این تحقیق پیشنهاد می‌شود، با توجه به این‌که نانودندیرم‌های پلی آمیدوآمین سمیت نسبتاً کم‌تری بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی دارند، بنابراین از این ماده می‌توان به عنوان عامل ضد باکتریایی استفاده کرد. با این حال استفاده از دندیرم به عنوان عامل ضد باکتریایی نیازمند مطالعات بیش‌تر و وسیع‌تر است.

تشکر و قدرانی

این مقاله حاصل بخش از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۴ با شماره مصوب ۴۹۳۵ است که بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در تامین

- [39] Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 1986; 19: 2466-2468.
- [40] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests. 19th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards. *Curr Microbiol* 2015; 70: 907-909.
- [41] Zapata A, Ramirez-Arcos S. A comparative study of mcFarland turbidity standards and the densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr Microbiol* 2015; 70: 907-909.
- [42] Divsar F, Ju H. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by using quantum dots-dendrimer nanocomposites for signal amplification. *Chem Commun* 2011; 47: 9879-9881.
- [43] Priyam A, Blumling DE, Knappenberger Jr KL. Synthesis, characterization, and self-organization of dendrimer-encapsulated HgTe quantum dots. *Langmuir* 2010; 26: 10636-10644.
- [44] Izanloo HT, Khazae M, Nazari Sh, Mjidi Gh, Vaziri Rad V, et al. The antimicrobial effects of polypropylenimine-G2 and polyamidoamine-G4 dendrimers on *klebsiella oxytoca*, *pseudomonas aeruginosa* and *proteus mirabilis*, in vitro experiment. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2014; 21: 925-933. (Persian).
- [45] Ravikumar S, Gokulakrishnan R. The inhibitory effect of metal oxide nanoparticles against poultry pathogens. *Int J Pharm Sci Drug Res* 2012; 4: 157-159.
- [46] Hermanson GT. Bioconjugate techniques: Third ed: Elsevier; 2013; p: 351-386.
- [47] Salimi H, Owlia P, Yakhchali B, Lari AR. Characterization of *pseudomonas aeruginosa* in burn patients using PCR-restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis. *Iran J Med Sci* 2015; 35: 236-241. (Persian).
- [48] Clancy J, Dupont L, Konstan M, Billings J, Fustik S, Goss C, et al. Phase II studies of nebulised Arikace in CF patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax* 2013; 68: 818-825.
- [49] MR BN, Hajia M. Multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* strains in Tehran reference burn hospital, Tehran, Iran. *African J Microbiol Res* 2012; 6: 1393-1396.
- [50] Shahcheraghi F, Feizabadi M, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). *Burns* 2003; 29: 547-551.
- [51] Mihani FK. MBL-producing *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with burn wound infections and PCR methods to identify blaVIM, blaIMP genes. *Iran J Microbiol* 2007; 1: 23-31. (Persian).
- [52] Shakibaie M, Shahcheraghi F, Hashemi A, Saeed Adeli N. Detection of TEM, SHV and PER Type extended-spectrum β -lactamas gene among clinical strains of *pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients at Shafa hospital. *Iran J Basic Med Sci* 2008; 11: 104-111.
- [53] Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystallites. *African J Microbiol Res* 2011; 5: 5465-5473.
- [54] Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 932-936.
- [55] Esmailzadeh H, Sangpour P, Khaksar R, Shahraz F. The effect of ZnO nanoparticles on the growth of *bacillus subtilis* and *escherichia coli* O157:H7. *Food Technol Nutr* 2014; 11: 21-28 (Persian).
- [56] Hoseinzadeh E, Alikhani MY, Samarghandi MR, Shirzad-Siboni M. Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Desal Water Treat* 2014; 52: 4969-4976.
- [57] Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Medical microbiology. United States 25th 1998; p: 73.
- [58] Janiszewska J, Swieton J, Lipkowski AW, Urbanczyk-Lipkowska Z. Low molecular mass peptide dendrimers that express antimicrobial properties. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 3711-3713.
- [59] Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res* 2006; 40: 3527-3532.
- microbial control: potential applications and implications. *Water Res* 2008; 42: 4591-602.
- [20] Eskandarlou A, Yousefi MR. The evaluation of bacterial contamination of active radiography apparatus in dental centers of Hamadan city. *J Hamadan Univ Med Sci* 2006; 12: 55-59 (Persian).
- [21] Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili M. A Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol* 2011; 162: 542-549.
- [22] Yari AR, Nazari Sh, Rastegar A, Alizadeh Matboo S, Majidi Gh, Tanhayeh Reshvanloo M. Removal of acid red 18 dye from aqueous solutions using nanoscale Zero-Valent Iron. *Iran J Health Sci* 2015; 3: 63-69.
- [23] Gholami M, Nazari Sh, Yari AR, Mohseni SM, Matboo SA. Removal of *E. coli* and *S. aureus* from polluted water using electrolysis method with Al-Fe electrodes. *Tehran Univ Med J* 2017; 75: 85-95.
- [24] Izanloo HN, Ahmadi Jebelli M, Alizadeh Matboo S, Hamid Reza Tashauoei, Vakili B, et al. Studying the polypropylenimine-G2 (PPI-G2) dendrimer performance in removal of *escherichia coli*, *proteus mirabilis*, *bacillus subtilis* and *staphylococcus aureus* from aqueous solution. *Arak Med Univ J* 2015; 18: 8-16. (Persian).
- [25] Izanloo H, Jebelli MA, Mjidi G, Khazaei M, Tashayoe HR, Vazirrad V, et al. The antibacterial effect of polypropylenimine-G2 dendrimer on *escherichia coli*, *enterobacter cloacae*, *bacillus subtilis*, and *staphylococcus aureus*. *Qom Univ Med Sci J* 2014; 8: 34-43 (Persian).
- [26] Dourbash FA, Alizadeh P, Nazari S, Farasat A. A highly bioactive poly (amido amine)/70S30C bioactive glass hybrid with photoluminescent and antimicrobial properties for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 78: 1135-1146.
- [27] Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface modification of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron Lett* 2012; 53: 6670-6675.
- [28] Abkenar SS, Malek RM, Mazaheri F. Salt-free dyeing isotherms of cotton fabric grafted with PPI dendrimers. *Cellulose* 2015; 22: 897-910.
- [29] Gholami M, Nazari S, Farzadkia M, Mohseni SM, Alizadeh Matboo S, Akbari Dourbash F, Hasannejad M. Nano polyamidoamine-G7 dendrimer synthesis and assessment the antibacterial effect in vitro. *Tehran Univ Med J* 2016; 74: 25-35. (Persian).
- [30] Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 3359-3368.
- [31] Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine* 2013; 9: 85-93.
- [32] Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine) dendrimers. *New J Chem* 2012; 36: 2215-2222.
- [33] Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari Sh, Safavi N, Tashauoei HR, et al. Studying the antibacterial effect of Polyamidoamine-G4 Dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *Arak Med Univ J* 2014; 17: 1-10 (Persian).
- [34] Gholami M, Mohammadi R, Arzanlou M, Dourbash FA, Kouhsari E, Majidi G, et al. In vitro antibacterial activity of poly (amidoamine)-G7 dendrimer. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 395.
- [35] Rastegar A, Nazari S, Allahabadi A, Falanji F, Akbari Dourbash F, Rezai Z, et al. Antibacterial activity of amino- and amido-terminated poly (amidoamine)-G6 dendrimer on isolated bacteria from clinical specimens and standard strains. *Med J Islam Repub Iran* 2017; 31: 368-376.
- [36] Gholami M, Nazari S, Farzadkia M, Majidi G, Alizadeh Matboo S. Assessment of nanopolyamidoamine-G7 dendrimer antibacterial effect in aqueous solution. *Tehran Univ Med J* 2016; 74: 159-167.
- [37] Xue X, Chen X, Mao X, Hou Z, Zhou Y, Bai H, et al. Amino-terminated generation 2 poly (amidoamine) dendrimer as a potential broad-spectrum, nonresistance-inducing antibacterial agent. *AAPS J* 2013; 15: 132-142.
- [38] Jain A, Singh K. Recent advances in the management of nosocomial infections. *JK Sci* 2007; 9: 3-8.

In vitro anti-bacterial effect of nano-polyamidoamine-G5 dendrimer

Soudabeh Alizadeh Matboo (B.Sc)¹, Shahram Nazari (Ph.D)^{*2}, Leila Mohammadi (B.Sc)³, Susan Bagheri (B.Sc)³, Fakhraddin Akbari Dourbash (M.Sc)⁴, Ahmadreza Yari (Ph.D)⁵, Seyyed Ahmad Mokhtari (Ph.D)⁶, Ali Niapour (Ph.D)⁷, Seyyed Mohsen Mohseni (Ph.D)⁸

1- Dept. of Public Health, Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2- Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Khalkhal Faculty of Medical Sciences and Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4- Dept. of Materials Science and Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5- Research Center for Environmental Pollutants, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

6- Dept. of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

7- Dept. of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

8- Dept. of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author, +98 4522289942

shahramnazari73@yahoo.com

Received: 10 Sep 2016; Accepted: 1 Aug 2018

Introduction: Progress in nanotechnology in the past decayed has created various opportunities for evaluation of biological effects such as anti-bacterial effects of nanoparticles. This study was aimed to examine synthesis and the antibacterial effect of Nano-Polyamidoamine-G5 (NPAMAM-G5) dendrimer on *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella Dysenteriae* and *Bacillus Subtilis*.

Materials and Methods: NPAMAM-G5 dendrimers was synthesized by Tomalia's divergent growth approach. The antibacterial effects of NPAMAM-G5 dendrimer were studied by disc diffusion and micro-dilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against gram-positive and gram-negative bacteria were determined according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Transmission electron microscopy (TEM) was used to analyze morphology and size of NPAMAM-G5.

Results: Zone of inhibition in concentration 25 µg/ml of NPAMAM-G5 dendrimers for *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella Dysenteriae* and *Bacillus Subtilis* were 27, 13, 30 and 18 mm, respectively. There was a significant difference regarding the zone of inhibition between gram-negative and gram-positive bacteria ($p < 0.05$). Remarkably, the MIC for *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa* and *Shigella Dysenteriae* was 2.5 µg/ml and for *Bacillus Subtilis* was 25 µg/ml. The MBC for *Shigella Dysenteriae* and *Pseudomonas aeruginosa* were 50 and 200 µg/ml, respectively and for *Klebsiella Oxytoca* and *Bacillus Subtilis* was 100 µg/ml. It was found that NPAMAM-G5 particles had a spherical shape with a mean diameter size of 10 nm.

Conclusion: According to the results, the NPAMAM-G5 dendrimer with end amine groups displayed a positive effect on the removal of standard strains of gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: Gram Positive Bacteria, Gram Negative Bacteria, Dendrimers, Polyamines, Microbial Sensitivity Tests